

**Poly-3-hydroxy butyric acid recovery from bacteria - by solvent extraction, esp. after spray drying, useful as plastics material**

**Patent Assignee:** IMPERIAL CHEM IND LTD

**Inventors:** ALDERSON B; HOLES M P A; SENIOR P J; WRIGHT L F

**Patent Family (8 patents, 11 countries)**

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Update	Type
<u>EP 15123</u>	A	19800903	EP 1981200352	A	19790829	198037	B
			EP 1980300431	A	19800214		
DK 198000733	A	19800922				198042	E
JP 55118394	A	19800911				198043	E
ZA 198000803	A	19810506				198130	E
<u>US 4324907</u>	A	19820413	US 1980125483	A	19800222	198217	E
<u>EP 15123</u>	B	19821222	EP 1980300431	A	19800214	198301	E
DE 3061384	G	19830127				198305	E
DE 3061823	G	19830310				198311	E

**Priority Application Number (Number Kind Date):** EP 1980300431 A 19800214; GB 197915859 A 19790508; GB 19796077 A 19790221; GB 19796076 A 19790221; GB 197915858 A 19790508

**Patent Details**

Patent Number	Kind	Language	Pages	Drawings	Filing Notes
<u>EP 15123</u>	A	EN			
Regional Designated States, Original	BE CH DE FR GB IT LU NL				
ZA 198000803	A	EN			
<u>EP 15123</u>	B	EN			

Regional Designated States, Original	BE CH DE FR GB IT LU NL
--	-------------------------

**Alerting Abstract:** EP A

Poly-3-hydroxy--butyric acid (I) is recovered from an aq. suspension of bacterial cells by spaying the suspension into a gas stream at  $\geq 100$  degrees (100-500) degrees C to evaporate the water, then solvent extracting (I) from the dried cells.

Pref. the cells are first washed to removed lipids and/or pigment, using a solvent (esp. acetone or methanol) which will not dissolve (I). The extraction solvents are esp. 1,2-dichloroethane (II),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and  $\text{CHCl}_3$ , and extraction is at  $>40$  degrees C using 10-100 wt. times solvent on dry wt. of cells.

In a modification (II) can be used to extract (I) directly from cell suspensions, opt. after rupturing the cells, at 10-40 degrees C with the pH of the (ruptured) cell suspension adjusted to within 0.5 units of the isoelectric point.

(I) can be used as a plastics material, e.g. the extracted solns. can be used directly for solvent-casting coatings, films or fibres. The cell residues after extraction can be used as feed or fertilizer. The spray-drying stage weakens the cells so that a separate milling stage is not required.

**International Classification (Main):** C07C-067/56 **(Additional/Secondary):** C07C-069/67, C07C-069/675, C08G-063/72, C12P-007/62

**US Classification, Issued:** 560185000, 210639000, 528361000

**Germany**

Publication Number: DE 3061384 G (Update 198305 E)

Publication Date: 19830127

Language: DE

Priority: GB 19796076 A 19790221 GB 19796077 A 19790221 GB 197915858 A 19790508 GB 197915859 A 19790508 DE 3061823 G (Update 198311 E)

Publication Date: 19830310

Language: DE

Priority: GB 19796076 A 19790221 GB 19796077 A 19790221 GB 197915858 A 19790508 GB 197915859 A 19790508

**Denmark**

Publication Number: DK 198000733 A (Update 198042 E)

Publication Date: 19800922

Language: DA

Priority: GB 19796076 A 19790221 GB 19796077 A 19790221 GB 197915858 A 19790508 GB

197915859 A 19790508

### European Patent Office

Publication Number: EP 15123 A (Update 198037 B)

Publication Date: 19800903

**\*\*Verfahren zur Extraktion von Poly-(3-Hydroxybuttersaeure) aus mikrobiellen Zellen A process for the extraction of poly-3-hydroxy-butyric acid from microbial cells Procède pour l'extraction de l'acide poly-(3-hydroxybutyrique) a partir de cellules microbiennes\*\***

Assignee: IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED, Imperial Chemical House Millbank, London SW1P 3JF, GB (ICIL)

Inventor: HOLESMA P A Wright, Leonard Frederick, 8, Blairmore Gardens Eaglescliffe, Stockton-on-Tees Cleveland, GB Alderson, Barry, 5 Sinderby Close, Billingham Cleveland, GB

Agent: Gratwick, Christopher, et al, Imperial Chemical Industries Limited Legal Department: Patents Thames House North Millbank, London SW1P 4QG, GB

Language: EN

Application: EP 1981200352 A 19790829 EP 1980300431 A 19800214 (Local application)

Priority: GB 19796076 A 19790221 GB 19796077 A 19790221 GB 197915858 A 19790508 GB 197915859 A 19790508

Designated States: (Regional Original) BE CH DE FR GB IT LU NL

Original IPC: C07C-67/56 C07C-69/67 C08G-63/72 C12P-7/62

Current IPC: C07C-67/56 C07C-69/67 C08G-63/72 C12P-7/62

Original Abstract: A process for the extraction of poly-3-hydroxy-butyric acid from microbial cells. Poly-3-hydroxybutyric acid is separated from bacterial cells by drying a finely divided stream or spray of an aqueous suspension of the cells with a gas heated to above 100(deg)C and then extracting the PHB, preferably after a lipid extraction step with a solvent such as methanol or acetone, with a PHB-solvent such as a partially halogenated hydrocarbon such as 1,2-dichloroethane, chloroform or dichloromethane. 1,2-Dichloroethane may also be used to extract PHB directly from an aqueous cell suspension without an intermediate drying step. In this case, for some bacteria, the suspension is preferably subjected to a cell disruption step, eg milling, prior to contact with the 1,2-dichloroethane. |EP 15123 B (Update 198301 E)

Publication Date: 19821222

**\*\*Verfahren zur Extraktion von Poly-(3-Hydroxybuttersaeure) aus mikrobiellen Zellen A process for the extraction of poly-3-hydroxy-butyric acid from microbial cells Procède pour l'extraction de l'acide poly-(3-hydroxybutyrique) a partir de cellules microbiennes\*\***

Assignee: IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC, Imperial Chemical House Millbank, London SW1P 3JF, GB

Inventor: Holmes, Paul Arthur, 27 Alprahan Crescent, Upton by Chester Cheshire, GB Wright, Leonard Frederick, 8, Blairmore Gardens Eaglescliffe, Stockton-on-Tees Cleveland, GB Alderson, Barry, 5 Sinderby Close, Billingham Cleveland, GB Senior, Peter James, Foulis Cottage Ingleby Greenhow, Middlesbrough Cleveland, GB

Agent: Gratwick, Christopher, et al, Imperial Chemical Industries PLC Legal Department: Patents Thames House North Millbank, London SW1P 4QG, GB

Language: EN

Application: EP 1980300431 A 19800214 (Local application)  
Designated States: (Regional Original) BE CH DE FR GB IT LU NL  
Original IPC: C12P-7/62 C08G-63/72  
Current IPC: C12P-7/62(A) C08G-63/72

### Japan

Publication Number: JP 55118394 A (Update 198043 E)  
Publication Date: 19800911  
Language: JA  
Priority: GB 19796077 A 19790221 GB 197915858 A 19790508

### United States

Publication Number: US 4324907 A (Update 198217 E)  
Publication Date: 19820413  
\*\*Extraction process\*\*  
Assignee: Imperial Chemical Industries Limited  
Inventor: Senior, Peter J., GB Wright, Leonard F. Alderson, Barry  
Agent: Cushman, Darby Cushman  
Language: EN  
Application: US 1980125483 A 19800222 (Local application)  
Priority: GB 19796076 A 19790221 GB 19796077 A 19790221 GB 197915858 A 19790508 GB 197915859 A 19790508  
Original IPC: C07C-67/56 C07C-69/675  
Current IPC: C07C-67/56(A) C07C-69/675  
Original US Class (main): 560185  
Original US Class (secondary): 210639 528361  
Original Abstract: Poly(beta-hydroxybutyric acid) is separated from bacterial cells by drying a finely divided stream or spray of an aqueous suspension of the cells with a gas heated to above 100(deg) C. and then extracting the PHB, preferably after a lipid extraction step with a solvent such as a partially halogenated hydrocarbon such as 1,2-dichloroethane, chloroform or dichlorom

### South Africa

Publication Number: ZA 198000803 A (Update 198130 E)  
Publication Date: 19810506  
Language: EN  
Priority: GB 19796076 A 19790221 GB 19796077 A 19790221 GB 197915858 A 19790508 GB 197915859 A 19790508

Derwent World Patents Index

© 2006 Derwent Information Ltd. All rights reserved.

Dialog® File Number 351 Accession Number 1958084

**EXTRACTION OF POLYY33OXY BUTYRIC ACID FROM BACTERIAL CELL**

**Publication number:** JP55118394

**Publication date:** 1980-09-11

**Inventor:** POORU AASAA HORUMUSU; REONARUDO  
FUREDERITSUKU RAITO; BARII ARUDAASON;  
PIITAA JIEEMUSU SENIAA

**Applicant:** ICI LTD

**Classification:**

**- international:** *C12P7/52; C12R1/38; C08G; C12P; C12P7/40; (IPC1-7): C12P7/52; C12R1/38*

**- european:**

**Application number:** JP19800021041 19800221

**Priority number(s):** GB19790006076 19790221

**Report a data error here**

Abstract not available for JP55118394

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑭ 特許出願公開

⑯ 公開特許公報 (A)

昭55-118394

⑮ Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑯ 公開 昭和55年(1980)9月11日

C 12 P 7/52

6760-4B

発明の数 2

C 12 R 1/38

6760-4B

審査請求 未請求

(全 10 頁)

⑰ 菌体からのポリ-3-オキシ酪酸の抽出方法

イギリス国クリーブランド・スト  
ツクトン・オン・ティース・  
ノートン・ザ・グリーン・ノー  
トン・ホール(番地なし)

⑰ 特 願 昭55-21041

⑰ 出 願 昭55(1980)2月21日

優先権主張 ⑱ 1979年2月21日 ⑲ イギリス  
(GB) ⑳ 7906076

⑰ 出 願 人  
インベリヤル・ケミカル・イン  
ダストリーズ・リミテッド  
イギリス国ロンドン市エスタブ  
リユー1ビー3ジエイエフ・ミ  
ルバンク・インベリヤル・ケミ  
カル・ハウス(番地なし)

⑰ 発 明 者  
ポール・アーサー・ホルムス  
イギリス国クリーブランド・ス  
ツクトン・オン・ティース・  
ノートン・ザ・グリーン・ノー  
トン・ホール(番地なし)

⑰ 代 理 人 弁理士 湯浅恭三 外2名  
最終頁に続く

⑰ 発 明 者  
レオナルド・フレデリック・ラ  
イト

明 細 書

1. [発明の名称]

菌体からのポリ-3-オキシ酪酸の抽出方法

2. [特許請求の範囲]

(1) ポリ-3-オキシ酪酸含有菌体の水性懸濁液から、ポリ-3-オキシ酪酸を抽出するに際して、  
使細を滴状にされた形態の脱水性懸濁液を、少な  
くとも100℃に加熱した気体流中へ導入して懸  
濁液から水を蒸発させ、得られる乾燥菌体を加熱  
し、菌体中のポリ-3-オキシ酪酸に対する溶媒  
である液体の抽出溶媒と接触させることにより乾  
燥菌体からポリ-3-オキシ酪酸を抽出し、そし  
てポリ-3-オキシ酪酸を溶解して含む抽出溶媒  
を菌体残骸から分離する；ことからなる菌体から  
のポリ-3-オキシ酪酸の抽出方法。

(2) 乾燥菌体を抽出溶媒と接触させるに先立つて、  
ポリ-3-オキシ酪酸を溶解しえないが菌体中の  
脂質および/または色素が存在する場合にはその  
色素を溶解しうる液体と乾燥菌体を接触させる特  
許請求の範囲第1項記載の方法。

(3) ポリ-3-オキシ酪酸を溶解しえない該液体  
はアセトンまたはメタノールである特許請求の範  
囲第2項記載の方法。

(4) 乾燥用の気体は100～500℃の範囲の温  
度に加熱される特許請求の範囲第1～3項のい  
ずれかに記載の方法。

(5) 抽出溶媒は部分ハロゲン化炭化水素である特  
許請求の範囲第1～4項のいずれかに記載の方法。

(6) 抽出溶媒は1, 2-ジクロロエタン、ジクロ  
ロメタンまたはクロロホルムである特許請求の範  
囲第5項記載の方法。

(7) 乾燥菌体を40℃以上の温度で抽出溶媒と接  
触させる特許請求の範囲第1～6項のいずれかに  
記載の方法。

(8) 抽出溶媒の重量は菌体乾燥重量の10～100  
倍である特許請求の範囲第1～7項のいずれかに  
記載の方法。

(9) ポリ-3-オキシ酪酸含有菌体からポリ-3-  
オキシ酪酸を抽出するに際して、該菌体を1,2-  
ジクロロエタンと接触させ、ポリ-3-オキシ

脂族含有界面活性剤と固体残渣から分離することからなる固体からのポリ-8-オキサン脂族の抽出方法。

(10) 固体を1, 2-ジクロロエタンと接触させるのに先立つて、固体の水性懸濁液を固体破壊工程に付す特許請求の範囲第9項記載の方法。

(11) 1, 2-ジクロロエタンを固体の水性懸濁液と接触させる特許請求の範囲第9または10項に記載の方法。

(12) 固体を10-40℃の温度で1, 2-ジクロロエタンと接触させる特許請求の範囲第10または11項記載の方法。

(13) 1, 2-ジクロロエタンとの接触に先立つて、水性懸濁液のpHを、固体の等電点pH値または固体を固体破壊工程に付す場合には破壊後の等電点pH値のプラス・マイナス0.5の範囲内に調節する特許請求の範囲第11項記載の方法。

(14) ポリ-8-オキサン脂族の抽出残渣からの分離は、ポリ-8-オキサン脂族を溶解することができないが抽出残渣と混和性である液体中でポリ-8-オキサン脂族を溶解させることにより行う特許請求の範囲第(5)

水の範囲第1-4項のいずれかに記載の方法。

## 2. (発明の詳細な説明)

本発明は抽出方法、特に微生物体からのポリ-8-オキサン脂族(以下、PHBと称することがある)の抽出方法に関する。

1920年代から、多くの微生物がその固体内にPHB顆粒をエネルギー-蓄積物質として蓄積していることは知られている。米国特許第3,107,172号明細書には、そのようなPHB含有固体を例えば噴霧乾燥機によつて乾燥し、得られた乾燥固体を成形用成形物として使用することが提案されている。固体からPHBを抽出し、それをプラスチック物質として使用するといういくつかの提案もなされているが、従来開示された方法は経済的に許容されてきていない。

PHBを抽出するには、一般的には固体をPHB可溶性溶媒と接触させPHBを溶解の固体物質から抽出させることが必要である。若干の例、例えばアノバクター属の菌類はそのPHBを容易に抽出残渣に対して放出するが、一方ではその抽出

(4)

の細菌、例えばシュードモナダセアエ(Pseudomonadaceae)は、より強固な固体を有し、固体破壊処理をしてから抽出残渣と接触する必要がある。

従来提案された抽出法には、水性相法から例えば遠心分離により、固体を採取して浸潤固体マズを得る工程が含まれ、これをアセトンと接触させて乾燥および固体破壊を行う。そのアセトンの除去後に、PHBを適当な溶媒、例えばピリジン(米国特許第3,036,959号)またはジクロロエタン/ニトロノール混合液(米国特許第3,044,942号)で抽出する。かかる方法は、アセトンが乾燥および固体破壊効果を有すると共に、脂質および色素を抽出するので有利である。そのような脂質および色素が存在すれば製品の純度が低下することになる。しかし、乾燥および固体破壊を行うためのアセトンでの浸潤固体の処理は大規模の場合には経済的でない。

別の方法は米国特許第3,275,610号明細書に記載されており、この方法では固体の水中懸濁

(5)

液を超音波振動に付して固体を破壊し、次いで遠心分離し、乾燥してから、クロロホルムのような溶媒で抽出する。そのクロロホルム溶液からのPHBの分離後にそのPHBを蒸気抽出除去のために洗浄する。

また米国特許第4,101,523号明細書には、乾燥固体から、または培養液から遠心分離により採取した菌体固体から直接に、固体をある種の環式カーボネート溶媒と共に加熱することにより抽出することも提案されている。

培養により得られた水性固体懸濁液から直接に(好ましくはある程度の濃縮後)、ある種の溶媒、例えばクロロホルム、ジクロロメタンまたは1,2-ジクロロエタンと接触させることにより(そして必要の場合にはそのような溶媒との接触前に固体破壊処理を合併して)PHBを抽出することも可能である。しかし、溶媒および抽出条件は、固体中に存在する非PHB物質、特に脂質および色素(存在するならば)の溶媒による過剰の溶解を防ぐような注意をして選択されなければならない。

(6)

そのように非PHB物質は製品（すなわちPHB）の純度を低下させて精製の問題を引き起こすだけでなく、脂質が同時に抽出されることにより脂相と水性相との間で比較的稳定なエマルジョンを形成し易く、かくてそれらの分離を困難にすることがある。そのような直接抽出法では、脂質を抽出する脂液と脂質と共に、PHB抽出脂液での蒸餾に先立って除去されなければならないので別個の脂質抽出処理工程を行わなければならないのが一般的であり、またより効率的な脂質脂液は水と混和性となり易いので、そのような脂質脂液の除去は実地上の問題を引き起こす。

我々は大型規模操作に適用できる特に簡単な方法工程によつてPHBを固体から抽出できることを見出した。

本発明によれば、PHB含有固体の水性懸濁液からPHBを抽出する方法であつて、微細な滴状にされた形態の致水性懸濁液を、少なくとも100℃に加熱した気体流中へ導入して脂液液から水を蒸発させ、得られる乾燥固体を捕集し、固体中の

(4)

エタノール、ブタノール、ヘキサンまたは石油エーテルのような脂質/色素溶液で抽出し、次いで、溶解された脂質/色素を含む脂液を固体から分離した後、固体をPHB抽出脂液と接触させることができる。脂質/色素抽出は乾燥固体をその脂液で還流することにより行なうのが好ましい。アセトンおよびメタノールは好ましい脂質抽出脂液である。脂質/色素抽出脂液は別のPHB非脂液例えばジニチルエーテルと混合して用いることもできる。

かかる脂質抽出によつて、固体のある程度の弱化も起こり、かくして次工程のPHB抽出が容易になることは了解されよう。

本発明方法においては、固体脂液液を微細な滴状（例えば噴霧または霧状蒸気状）で少なくとも100℃の温度の気体流（例えば空気）中へ導入することからなる乾燥処理によつて、固体は水性脂液液から分離される。好ましくは、脂液液は、スプレーまたはアトマイザーノズルを介して導入する。かかる乾燥処理は周知であり、例えば噴霧

(5)

PHBに対する脂液である液体の抽出脂液と接触させることにより乾燥固体からPHBを抽出し、そしてPHBを溶解して含む抽出脂液を固体残渣から分離することを特徴とする固体からのPHBの抽出方法が提供される。

我々はいかなる乾燥式の方法は固体を充分に弱化させて、何ら別個の固体残渣処理工程を必要とすることなくPHBを抽出可能にすることを発見した。特に強固な脂液液については、例えばミーリングのような別個の固体残渣処理工程を行なつてから乾燥処理することはPHBの抽出収率の増加のためには望ましいけれども、我々は乾燥処理前のそのような別個の固体残渣処理は必ずしも必要ではなく、実際には、ミーリング処理脂液液の乾燥処理によつて乾燥液中における堆積のような問題を生ずるので、可能なならばそのような処理を行なわないのが望ましいである。

本発明の方法においては、固体を脂質抽出処理に付してからPHB抽出脂液と接触させるのが好ましい。従つて乾燥固体をアセトン、メタノール、

(6)

乾燥法およびフラクション乾燥法がある。

加熱気体導入口温度は100〜500℃であつてよいが、好ましくは120〜250℃である。

加熱気体流によつて水分が蒸発除去され、この水分は気体流で運び去られて、熱つた乾燥固体は捕集されて、PHB抽出脂液による抽出工程へ送られる。

適当なPHB抽出脂液の例としては、ピリジン、環式カーボネート化合物、および特に部分塩素化炭化水素類（例えばクロロホルム、ジクロルメタンおよび1,2-ジクロルエタン）がある。1,2-ジクロルエタンは通常PHBの溶媒とは考えられず、この理由はPHBが固体から離れた後には1,2-ジクロルエタン中に容易にまたは完全に溶解しないからである。従つて固体残渣から分離されたPHB溶液は単一相であるように見えるが、乾燥後に1,2-ジクロルエタン中にPHBを再溶解させることによつて作つた溶液は（僅めて懸濁液を除く）、パール乳白色の外観を呈し、従つて一旦沈澱され、乾燥されたPHBは

(10)



1, 2-ジクロロエタン中には容易には再溶解しない。従つて、そのような溶媒が固体からのPHBの抽出に有効であることは驚くべきことである。

1, 2-ジクロロエタンは乾燥固体からPHBを抽出するのに用いるのに適当な溶媒であるばかりでなく、以下に述べるように、1, 2-ジクロロエタンはある条件下では水性固体懸濁液からPHBを直接に抽出するのに用いても抽出されるPHBが同時に抽出される物質で飽和低下するようになることはほとんどない。従つて本発明の一態様によれば、PHB含有固体からPHBを抽出する方法であつて、固体を1, 2-ジクロロエタンと接触させ、PHB含有溶媒相を固体残渣から分離することを特徴とするPHB抽出法が提供される。

水性固体懸濁液を抽出溶媒としての1, 2-ジクロロエタンと接触させる(もし強固な容器を用いる場合にはミールンまたは他の固体破砕処理後にこれを行なう)直接抽出法においては、抽出溶媒の温度は40℃以下としてその溶媒による非PHB物質の過度の抽出を防ぐようにすべきであ

(11)

いと粗PHBの抽出効率が低くなり、過大な粘度の溶媒が得られることがあり、他方溶媒の量が多いと不経済である。溶媒の量は、抽出溶媒が0.5~5%、好ましくは1~2%(重量)のPHBを含むような量であるのが好ましい。

抽出のための接触時間は、不経済的に長くならずに適正な抽出が達成されるようを経験によつて決定される。

抽出溶媒との接触前に固体を乾燥させる場合には、PHB含有溶媒からの固体残渣の分離は簡単な伊達または遠心分離処理によつて行なうことができる。固体を固液抽出処理に付してからPHB抽出を行なう場合には、固体残渣からのPHB含有溶媒の伊達は等々容易となり易く、従つて比較的短いフィルターを用いて行なうことができる。固体の水性懸濁液を1, 2-ジクロロエタンと接触させてPHBを抽出する場合には、固体残渣は水性相(固体残渣は水性相中に懸濁している)から1, 2-ジクロロエタン相(PHBが溶解されている)を分離することにより除去できる。安定

(13)

る。これとは対照的に、前述のように固体を乾燥させてから溶媒と接触させる場合には、抽出は40℃以上の温度で実施するのが好ましい。従つて、溶媒の沸点までの温度(沸点を含む)を使用することができ、大気圧以上の圧力を用いて大気圧における溶媒沸点よりも、高い温度を使用するようである。

固体を抽出処理前に乾燥する場合(前述のような理由で好ましくない)で、固体懸濁液を固体破砕処理(例えばミールン処理)に付してから乾燥する。抽出温度は40℃以下として溶媒の過度の抽出を防ぐべきである。従つて、もし、ミールン処理懸濁液を乾燥し、熱溶媒で抽出するならば、溶媒からのPHBの沈殿の際に、セラチンの粘着性物が形成され易い。しかし溶質抽出処理を行なつてからPHB溶媒と接触させる場合には、PHB残渣での抽出は40℃以上の温度で行なうことができる。

使用するPHB每重量は固体乾燥重量の10~100倍であるのが好ましい。残渣の量が少な

(12)

エマルジョンが形成されることがあるので1, 2-ジクロロエタン相を水性相から分離するのが困難となる場合がある。若干の場合には遠心分離によつてそのような分離は促進されるけれども、大規模操作では遠心分離は必ずしも効果的でなく、好適でないこともある。

我々は、溶媒と水性相との分離は、抽出溶媒1, 2-ジクロロエタンとの接触に先立つて、水性相のpHを固体の等電点のpH値のプラス・マイナス0.5の範囲内に調節することによつて促進されることを見出した。以下に述べるように、若干の固体については、固体水性懸濁液と1, 2-ジクロロエタンとの接触に先立つて固体を破砕するのが望ましい。破砕固体の等電点は未破砕固体の等電点と異なることがある。固体が破砕される場合には、pHは破砕固体の等電点pH値のプラス・マイナス0.5の範囲内に調節すべきである。固体破砕に先立つて固体懸濁液に充分なpH調節剤を添加して、破砕の際に破砕固体の等電点pH値のプラス・マイナス0.5の範囲内のpHを得る

(14)

こともできるけれども、固体炭素処理後に  $pH$  を調整するのが好ましい。

固体の等電点は、固体が固定の価陽または陰電荷を有しない  $pH$  値、すなわち固体が電気的に中和している  $pH$  値である。等電点は、種々の  $pH$  値での粒子電気泳動を測定して決定することができる、かくして電荷がゼロとなる  $pH$  が求められる。

一般に  $PHB$  蓄積性細菌については、その未培養および培養後の両者の等電点は  $pH$  4~5.5 の範囲である。しかし培養中の水性培地の  $pH$  は一般に 6~8 の範囲であり、その近値は使用細菌の性質やその他の培養条件によつて左右される。上述のように水性培地の  $pH$  は等電点  $pH$  の 0.5 以内に調整されるべきである。好ましくは等電点の 0.25  $pH$  単位内、特に等電点プラス 0.25  $pH$  単位内に調整される。かかる  $pH$  調整は、固体を乾燥してから  $PHB$  抽出溶媒と接触させる場合には必要でないことは明かである。

固体残渣からの  $PHB$  含有抽出溶媒の分離後、その  $PHB$  濃度は、所望ならば、さらに昇過して

(10)

懸濁液を除去してもよい。かかる昇過は、5  $\mu m$  以下、好ましくは 2  $\mu m$  以下の孔径法のフィルター、例えばガラスファイバーフィルターを用いて行なうのが好ましい。

分離した  $PHB$  含有溶媒は（好ましくは昇過後）、被覆、フィルムまたは繊維のようなソルベント在製品物の製造のために直接に使用することができる、あるいはさらにそれを処理して、（例えば被覆の溶媒により、または  $PHB$  を溶解しないが溶媒とは選択性である媒体中へ  $PHB$  含有溶媒を添加して沈降させることにより）固体  $PHB$  を分離することもできる。そのように成膜用の媒体の例としては、石油エーテルおよびメタノール/水混液がある。 $PHB$  は、所望により、メタノールまたはアセトンで洗浄することにより精製できる。

$PHB$  の抽出後の固体残渣は、さらに加工して他の用途、例えば食品（飼料）または肥料に用いることができる。

$PHB$  蓄積性を有するいずれの細菌も  $PHB$  含有固体の生産に使用しうる。「アドバンス・イン・

(11)

マイクログバイアル・フィジオロジー」1978、10、208~286 のシニア等の論文には 1972 年 6 月までに発表された細菌が挙げられている。その他の細菌は米田特許第 8072588 号にリゾビウム突然変異菌、英特許第 1585682 号に特にアルカリゲネス・エクトロファス、ペンサス・メガテリウム、ゾグロエファ・ラミグラおよびマイコプラズマの突然変異株が記載されている。好ましいものの中でも、アゾトバクテリウム（特にクロコカルム種）、アルカリゲネス属（特にエクトロファス種）およびシニードモナダエア属、特にシニードモナス A11 およびメテロバクテリウム・オルガノフィラム種を挙げることができる。

それらの細菌の中でも好ましいものは、多くの基質例えば炭水化物、エタノール、メタノール、多価アルコール、二酸化炭素/水果およびカルボン酸のうちの 1 つまたはそれ以上を同化することができる、かつ使用基質に応じて好気的または嫌氣的に生育しうる細菌である。本発明は、アルコール

(12)

特にメタノールの基質で好気培養条件下で生育したシニードモナス A11 属の固体からの  $PHB$  分離に特に有用である。本発明はシニードモナスまたはグルコースのような水溶性炭水化物で生育したアゾトバクテリウム属の固体からの  $PHB$  分離にも特に有用である。

培養法によつて得られる固体懸濁液には、典型的には 20~55% のバイオマスが含まれている。かかる懸濁液が中間の乾燥処理なしで 1,2-ジクロロエタンまたは色素/脂質抽出溶媒と接触されるときには、強制的に抽出のためには、その固体懸濁液は 5~15 重量% のバイオマス固形分濃度を有するのが好ましい。固体懸濁液は必要ならば例えば遠心分離によつて濃縮して、上記の濃度範囲とされる。（固体懸濁液は、培養されたままの状態に既にこの範囲の濃度となつてゐることがあるけれども、そのような場合でも濃縮するのが好ましいことがある。）

我々は、 $PHB$  を 1,2-ジクロロエタンによつて水性固体懸濁液から直接に抽出する場合、

(13)

PHBは別個の固体破壊処理をする必要なく若干の細断からは抽出できることを発見した。かくして、アソバクター属およびアルカリゲネス属の細菌は1, 2-ジクロロエタン溶液に対して容易にPHBを抽出するので、抽出処理には固体懸濁液と溶液とを攪拌するだけで足りる。この場合の攪拌機は相対運動する鋼製表面を有し、かくして緩和な剪断を与えるようなものが好ましい。シルバースン(商標: Silverson)ブレンダーは混合するのに使用できる。一層微細な細菌(例えばシユドモナダセア属)は固体液素のための別個の処理を必要とする。この破壊は水性固体懸濁液を、例えばホモジナイザー、ビーズミリング、ローラーミリングまたはフレンチプレスリングにより剪断することにより行なうことができる。他の固体破壊方法の例としては、浸透圧ショック、音波もしくは超音波振動、および酵素による固体壁分解がある。次は培養環境で処理して固体膜を化学的に破壊する方法を用いることができるが、普通それによりPHBが著しく分解されるので好

(10)

ナシヨナル・コングリジョン・オブ・インダストリアル・バクテリアに寄託された固体の番号である)。上記ペレットを旋動床乾燥器中で40℃で10時間乾燥した。

得られた乾燥固体の10gを500mlの1, 2-ジクロロエタン中に室温で15分間懸濁させ、次いで溶液相を遠心分離およびデカンテーションによつて取出した。この溶液を2000mlのメタノール/水混液(容量比メタノール:水=1:1)に強く攪拌しながら添加し、粗PHBを沈澱させた。この沈澱を濾紙上に捕集し、減圧下50℃で乾燥した。粗PHBの収率は0.5g未満であつた。

上記の実験を繰返したが、乾燥固体を1, 2-ジクロロエタンと共にシルバースン(Silverson)ミキサー中で室温で15分間剪断した。粗PHBの収率は1.4gであつた。

上記の実験を繰返したが、乾燥固体を1, 2-ジクロロエタンによつて88℃で15分間連続処理した。粗PHB(純度94.5%)の収率は2.9gであつた。

(21)

ましくない。意外にも、我々は固体懸濁液を噴霧乾燥またはフラッシュ乾燥すると固体が充分に粉化されて、別の固体破壊処理をしなくてもPHBの抽出ができることを発見した。従つて水性固体懸濁液を噴霧またはフラッシュ乾燥してから抽出(PHB用)と接触させる場合には、特別の固体破壊処理は必要ではない。

本発明を以下の例によつて説明する(gは重量%である)。

#### 例 1 (比較)

この例は、単純な空気乾燥では効率的なPHB抽出を可能とするような充分な固体の粉化は達成されないことを示すものである。

メチロバクテリウム・オルガノフィラム(NCIB 11488; 上の詳細は我々の米国特許出願第7906078号)の水性懸濁液1000ml(60gのバイオマス固形分を含み、そのうちの88gがPHB)を遠心分離して菌体懸液ペレットを得た。(NCIB番号は、スプラット・アバーディーンのトリイ・リサーチ・ステーションの

(20)

収率は下記式で計算した。

$$\frac{\text{回収粗PHB重量}}{\text{使用固体乾燥重量}} \times \frac{100}{\text{固体中のPHB\%}} \times 100$$

#### 例 2

例1で用いた固体の水性懸濁液500.0mlを噴霧乾燥した。この際の懸濁液供給速度は500.0ml/時、空気入口速度は150℃、空気出口速度は50℃であり、そして空気流量は800ml/時であつた。

噴霧乾燥固体20gを1, 2-ジクロロエタン1000ml中に室温で15分間懸濁させた。固体破片をウオットマン(Watman)541濾紙で除去した。得られた溶液を5000mlのメタノール/水(4:1容)混合液に強く攪拌しつつ添加してPHBを沈澱回収した。沈澱を濾紙で捕集した。粗PHBの収率は5.7gであつた。

上記の実験を繰返したが、乾燥固体を1, 2-ジクロロエタンと共にシルバースン・ミキサー中で室温で15分間剪断した。粗PHB(純度98.2%)の収率は12.2gであつた。

(22)

上記の実験を繰返したが、乾燥固体を1, 2-ジクロロエタンによつて88℃で15分間遠流処理した。粗PHB(純度98.5%)の収率は98.5%であつた。沈澱をメタノール500mlで5回洗浄し、106℃で乾燥した。洗浄PHBの純度は98.7%であつた。

## 例 8

例2で用いた噴霧乾燥固体の20gを600mlのアセトンで55℃において5分間遠流して、脂質および色素を抽出し、伊通によりアセトンを除去した。残留固体を1000mlの1, 2-ジクロロエタンと共にソルベンソンミキサー中で遠流で15分間剪断した。得られた溶液をウオットマン541伊紙で固体残渣から分離した。溶液に5000mlのメタノール/水(4:1)混合液を激しく攪拌しつつ添加することによりPHBを沈澱させ、その沈澱を伊通で捕集した。粗PHB(純度96.7%)の収率は48.2%であつた。

上記の実験を繰返したが、アセトン抽出条件を1, 2-ジクロロエタンと共に剪断する代りにそ(25)

ろ、そしてPHB抽出溶液として1, 2-ジクロロエタンの代りにジクロロメタンを用いて例4を繰返した。PHB(純度98%)の収率は95%以上であつた。

PHB抽出溶液としてクロロホルムを用いても同様の結果が得られた。

## 例 9

アゾトバクター・クロオコケウム(NCIB 9125)の培養液を、炭素過剰、酸素制限および基質塩濃度の条件下に水性培地中でグルコースの固形により製造した。固体培養液は20g/4のバイオマス固形分を含み、その固形分のPHB含量は40%であつた。次いで懸濁液を遠心分離により濃縮し80g/4のバイオマス固形分の固体クリームとした。

固体クリーム500mlを20℃の1, 2-ジクロロエタン1000mlに加え、ソルベンソン・ブレンダー・モデルL2Eにより10分間混合した。攪拌エネルギーにより温度が40℃に上昇した。得られたエマルジョンを冷却し、15℃で18000

(25)

のアセトン抽出固体を1, 2-ジクロロエタンで88℃において15分間遠流処理した。粗PHB(純度98.4%)の収率は95%であつた。

従つて、アセトン抽出処理は冷1, 2-ジクロロエタンにより一層多くのPHBの抽出を可能にするように噴霧乾燥固体を弱化するけれども、噴霧乾燥処理単独でも希薄1, 2-ジクロロエタンによりPHBの抽出が可能となる程度に固体を弱化させることが判る。しかしアセトン抽出処理は抽出されるPHBの純度を向上させる。

## 例 4

アゾトバクター・クロオコケウム(Akroococcus)(NCIB 9125)の水性懸濁液(60g/4)のバイオマス固形分を含み、その87.8%がPHBを噴霧乾燥し、アセトン抽出し、遠流下で1, 2-ジクロロエタンで抽出し、そして沈澱させた(例8と同じ条件)。粗PHB(純度98%)の収率は89.4%であつた。

## 例 5

脂質抽出溶液としてアセトンの代りにメタノール(24)

で15分間遠心分離した。水性培養液および固体破片よりなる上層層をデカンテーションで除いた。PHBを溶解して含む1, 2-ジクロロエタンよりなる下層層を500mlのエタノール/水(4:1)1容)溶液中へ激しく攪拌しながら徐々に注ぎ込んだ。

かくして得られた沈澱PHB(純度97.5%)を伊通で捕集し、メタノール1000mlで5回洗浄し、減圧下で50℃で乾燥した。これを化学分析したところ下記の組成(%)を有した。

C 55.5, H 7.0, O 37.0,  
N < 0.2 (窒素値: C 55.5, H  
6.9, O 37.2)。この値は99.5%

以上の純度に相当する。固体PHBは塊状の集合であつた。収量は14.7g(収率92%)であつた。

比較のため抽出溶液としてクロロホルムを用いて上記の操作を繰返したとき、収量は16.6gであつたが、純度(メタノール洗浄前)はわずかに88.6%であつた。

(26)

## 例 7

水性増地中でメタノール懸濁液により作り、20 g/ℓの全バイオマス固形分（そのうち28 gがPHB）を含むシュードモナスAM1 (NCIB 9188) の菌体の水性懸濁液を、例6の方法により1, 2-ジクロロエタンと接触させて抽出したが、この場合には濃縮して120 g/ℓのバイオマス固形分を含む菌体クリームとした後に、菌体をダイノミル(Dynomil)で破砕した。この時の処理速度は15 ℓ/時であり、入口温度20℃、出口温度40℃であった。

得られたPHBの純度（メタノール洗浄前）は93.2%、収率は77%であった。

## 例 8

例1で用いた菌体の水性懸濁液を遠心分離で120 g/ℓのバイオマス固形分を含む菌体クリームとしたものを用いて例7を繰返した。粗PHB（純度93.2%）の収率は68.8%であった。この収率の水準は、分離した下層がわずかに750 mlの容量であったこと（すなわち1, 2-ジクロ

(27)

ロエタンのわずかに75%がエマルジョンから分離されたにすぎなかったこと）によるものである。もしすべての1, 2-ジクロロエタンが分離されていたとすれば、計算によるPHB収率は約85%であった。

## 例 9

例6を繰返したが、この場合には菌体クリーム（pH7、培養後数週間貯蔵）と1, 2-ジクロロエタンをソルバーソブレンダ-中で混合した後、エマルジョンを冷却し遠心分離で分離する代りに自然重力下で80分静置した。この時間中にエマルジョンは菌体破片を含む上層と、PHB含有1, 2-ジクロロエタン溶液の下層とに分離した。回収した下層の容量はわずかに170 mlであった。1時間放置した後でも、分離下層の容量はわずかに420 mlであった。この系(pH7)で迅速な分離を達成するには、エマルジョンを冷却し、15℃で15分間遠心分離する必要がある。

## 例 10

(28)

例9を繰返したが菌体クリームのpHを種々の値に調整してから、そのクリーム状エマルジョンを1, 2-ジクロロエタンと接触させた。80分および60分間静置したときに分離する1, 2-ジクロロエタン溶液の量は下段の通りであった。

pH	分離した1, 2-ジクロロエタンの容量(ml)	
	80分後	60分後
4	0 (安定エマルジョン)	80
4.5	410	—
5	550	770
5.5	640	—
6	290	700
7	170	420
8	60	800
9	50	270
10	30	—

菌体クリームの等電点を測定したところ、pH5であった。

## 例 11

(29)

アゾトバクター・クロコキウム (NCIB 9123) のpH5の等電点を有する新たに培養した菌体クリーム（約40%のPHBを含む）を用いて例9を繰返した。pHを5に調整してから菌体クリームを1, 2-ジクロロエタンと接触させた。自然重力下でわずかに10分後に水性層と1, 2-ジクロロエタン層とが迅速に分離し、550 mlの1, 2-ジクロロエタン層が分離し、回収できた。例6のようにしてPHBを沈澱させ、洗浄した。PHB（純度99.5%）の収率は84%であった。

## 例 12

pH7.0の水性増地中でメタノールの好気菌種によりシュードモナスAM1 (NCIB 9188) の菌体水性懸濁液を作った。この液は20 g/ℓの全バイオマス固形分（80%がPHB）を含んでいた。この液を遠心分離で濃縮して80 g/ℓのバイオマス固形分の菌体クリームとした。これをダイノミルで破砕して菌体を破砕した。処理速度は12 ℓ/時であり、入口温度20℃、出口温

(30)

度40℃であつた。得られた試験面体の導電率は $pH$  4.75であつた。

試験面体の懸濁液の $pH$ を4.75に調節し、この懸濁液の500mlを1号の1, 2-ジクロロエタンに添加した。この混合物をシルバー・ソング・ブレンダー・モデルL2Rを低速混合速度で用いて10分間混合した。得られたエマルジョンを測定した。

10分後に500mlの1, 2-ジクロロエタンが分離していた。次いで $pH$ を例6の方法で1, 2-ジクロロエタンから分離した。 $pH$ 収率は78%であつた。

$pH$ 調節を全く行わずに上記実験を繰返したときに、試験面体懸濁液および1, 2-ジクロロエタンの混合の際に、比較的安定なエマルジョンが形成され、このものは速に分離したときにだけ分離した。

#### 例 18

抽出溶媒としての種々の溶媒の有効性を比較するため、500mlのアソトベクター・クロロ

ラム(NCIB 9125)の固体クリーム(バイオマス固形分含量50g/g;  $pH$  5.0)を、試験面体1号に20℃で注ぎ込んだ。得られた混合物をシルバー・ソング・ブレンダー・モデルL2Rで10分間混合し、重力下で分離させた。50分および60分後に分離した溶媒の量を測定した。分離後、蒸留(ここではシロップと称する)をサイフォンで取出し、その固形分を試料の蒸発乾固により測定した。シロップの $pH$ 含量は例5のような水/メタノール溶液中での沈澱により測定した。

シルバー・ソング・ブレンダーでの混合の代りに遠心条件下で15分間処理することにより上記の操作を繰返した。結果を下表に示す。

(32)

溶 媒	冷 抽 出				遠心抽出	
	回収率 (%)		シロップの固形分含量 (%)		シロップの固形分含量 (%)	
	80分	60分	全	$pH$	全	$pH$
1,2-ジクロロエタン	55	75	1.15	0.89	1.82	0.92
クロロホルム	0	0	1.27	0.92	1.85	0.95
ジクロロメタン	12	35	1.51	0.95	1.07	0.69
1,1,1-トリクロロエタン	45	60	0.8	ND	0.85	ND
1,1,2-トリクロロエタン	45	50	0.12	ND	0.22	ND
1,1,2,2-テトラクロロエタン	85	90	0.01	ND	0.05	ND
ピリジン	0	0	0.01	ND	—	—
1,2-プロピレンカーボネート	8	15	0.01	ND	ND	ND

ND=測定

※ 静置に際し分離が不良のため、エマルジョンを速に分離して、全固形分および $pH$ 含量を

(33)

定のためのサンプルを得た。

種々の溶媒中における $pH$ の溶解特性を調べるため、冷抽出で得られた沈澱 $pH$ のクロロホルム、ジクロロメタンおよび1, 2-ジクロロエタンによる再溶解を、各別量の冷溶媒と乾燥後の沈澱 $pH$ とを混合することにより試みた。沈澱 $pH$ は冷クロロホルムまたは冷ジクロロメタンには再溶解したが、冷1, 2-ジクロロエタンには溶解性でなかつた。

特許出願人 インベリヤル・ケミカル・インダストリーズ・リミテッド

代 理 人 弁 理 士 湯 浅 幸 三

(外2名)

(34)

第1頁の続き

優先権主張 ②1979年2月21日③イギリス  
(GB)④7906077

②1979年5月8日③イギリス  
(GB)④7915858

⑦発明者 バリー・アルダーソン  
イギリス国クリーブランド・ス  
トックトン・オン・ティース・  
ノートン・ザ・グリーン・ノー  
トン・ホール(番地なし)

⑧発明者 ピーター・ジェームス・セニア

イギリス国クリーブランド・ス  
トックトン・オン・ティース・  
ノートン・ザ・グリーン・ノー  
トン・ホール(番地なし)